

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-066871

(43)Date of publication of application : 03.03.1992

(51)Int.Cl.

G01N 33/53

G01N 33/543

(21)Application number : 02-180254

(71)Applicant : ISHIKAWA EIJI

(22)Date of filing : 07.07.1990

(72)Inventor : ISHIKAWA EIJI
KONO TAKEYUKI

(54) HIGH SENSITIVE IMMUNOASSAY

(57)Abstract:

PURPOSE: To make a highly sensitive immunity measurement preventing an influence of a non-singular binding to a solid phase by making a sandwich type immunity measurement using a labeling body prepared through biotin- avidin, etc. under coexistence of avidin, etc.

CONSTITUTION: A labeling body reacting a biotin binding body with a labeling body of avidin, etc. is prepared. A sandwich-shaped immunity complex (hereinafter called the complex) is bound to a solid phase, using this labeling body and a solidifying substance under of coexistence of avidin or streptoavidin (STA). And the labeling body and the quantity of an objective substance is measured. There are two methods in the measurement of a labeled substance, whether the measurement is done as the complex is formed on the solid phase or after dissolved from the solid phase. Avidin is added where the avidin labeling body is used or STA is added where the STA labeling body is used, respectively at the same time when the labeled body is added because avidin or STA is coexisted in either case. The non-singular binding of the labeled body to the solid phase is prevented because avidin, etc. are non-singularly bound to the solid phase by this and the highly sensitive immunity measurement becomes possible.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑫ 公開特許公報(A)

平4-66871

⑤ Int.Cl.⁵G 01 N 33/53
33/543

識別記号

U
N

庁内整理番号

7906-2J
7906-2J

⑬ 公開 平成4年(1992)3月3日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全15頁)

⑭ 発明の名称 高感度な免疫測定法

⑯ 特 願 平2-180254

⑰ 出 願 平2(1990)7月7日

⑱ 発 明 者 石 川 栄 治 宮崎県宮崎市大塚台西3丁目24番1
 ⑱ 発 明 者 河 野 武 幸 宮崎県宮崎市中津瀬町85番地 サーバス中津瀬810号室
 ⑲ 出 願 人 石 川 栄 治 宮崎県宮崎市大塚台西3丁目24番1
 ⑲ 代 理 人 弁理士 細田 芳徳 外1名

明 細 書

1. 発明の名称

高感度な免疫測定法

2. 特許請求の範囲

- (1) 一般式(a)又は(b)で示されるビオチンとアビジンの結合またはビオチンとストレプトアビジンの結合を介した標識物、

(a): X-ビオチン-アビジン-標識物

(b): X-ビオチン-ストレプトアビジン-標識物

(式中、Xは抗原、抗体及び抗抗体からなる群から選ばれる免疫反応物質を表す。)

及び固相化物質を用いて、アビジン又はストレプトアビジンの共存下において検体中の目的物質を含むサンドイッチ状免疫複合体を固相上に形成せしめる工程を有することを特徴とする目的物質の免疫測定法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は高感度な免疫測定法に関する。更に詳しくは、ビオチンとアビジンの結合又はビオチン

とストレプトアビジンの結合を介して標識をした免疫反応物質を、アビジン又はストレプトアビジンの共存下において用いた、目的物質の免疫測定法に関する。

〔従来の技術〕

従来、免疫測定法による検体中の目的物質の定量的測定は、該目的物質と免疫複合体を形成し得る免疫反応物質に対して直接標識物を結合させ、該標識物と固相に結合した他の免疫反応物質との間で、サンドイッチ状に該目的物質の免疫複合体を固相上に形成せしめ、次いで、固相に結合した標識物を測定する免疫測定法が広く行なわれている。

例えば、標識物が酵素であり検体中の目的物質が抗体の場合は、酵素標識抗体と固相に結合した抗原とで目的物質である抗体とのサンドイッチ状免疫複合体を固相上に形成し、固相に結合した酵素の活性を測定する方法が一般的に用いられている。また、検体中の目的物質が抗原の場合は、酵素標識抗体と固相に結合した抗体とで、目的物

質である抗原とのサンドイッチ状免疫複合体を固相上に形成し、固相に結合した酵素の活性を測定する方法が一般的に用いられている。

しかし、抗原、抗体等の目的物質の測定における最大の問題点は、標識体の固相への非特異結合にある。標識体の固相への非特異結合の原因には、標識体の固相への直接の非特異結合と検体中の標識体と結合可能な物質の非特異結合を介しての2種類に大別される。この非特異結合の影響をできるだけ低減せしめることにより、測定感度の上昇及び測定値の信頼性を向上する方法が幾つか発表されている。例えば、酵素標識体の固相への直接の非特異結合を低減するため、酵素標識体の製造方法が種々検討されている〔石川ら、「蛋白質・核酸・酵素」別冊No.31, 37~45(1987)〕。また、検体中の標識体と結合可能な物質の固相への非特異結合は、目的物質が抗体の場合、重要な問題であるが、この場合の非特異結合を低減する方法として、標識抗原と固相に結合した抗原とで目的物質である抗体とのサンドイッチ状免疫複合体を固

相上に形成し、固相に結合した標識物を測定する方法が報告されている(遠藤ら、Clin. Chim. Acta, 103, 67-77 (1980))。

最近、改良方法として抗原を直接結合した固相の代わりに、ジニトロフェニル基のようなハプテンを結合した抗原を用いて、目的物質である抗体と標識抗原のサンドイッチ状免疫複合体を形成し、該サンドイッチ状免疫複合体を抗ジニトロフェニル基抗体のような抗ハプテン抗体を結合した固相に結合し、固相に結合した標識物を測定する方法が報告されている。この方法は、抗原と特異抗体との反応を溶液で行い、形成されたサンドイッチ状免疫複合体を結合能の高い結合で固相に結合することができ、短時間で高感度の抗体測定が可能となった(特開平1-312464号)。

更に、標識体の固相への非特異結合を低減させる方法が本発明者により開発されている。即ち、上述のような固相上に形成された検体中の目的物質、標識物及び免疫反応物質からなるサンドイッチ状免疫複合体を固相から溶出せしめた後、標識

物を測定する方法である。例えば、抗体の測定において、サンドイッチ状免疫複合体を結合した固相にハプテンを加えることにより、固相よりサンドイッチ状免疫複合体を溶出せしめ、溶出液中の酵素活性を測定することにより、さらに高感度の測定が可能となった(特願平1-17873号)。また、この溶出液を抗抗体の結合した固相に結合させることにより、抗体のクラス別の測定(Immune Complex Transfer Method法)も可能となった(特開平2-28558号)。

このように、標識体を用いる抗原、抗体等の測定は有用な方法であり、種々の改良方法が提案されている。

例えば、抗体、抗原であるタンパク質やペプチド等の酵素標識体の製造方法としては、種々の酵素標識法が開発されてきた。抗体、抗原の酵素標識法の開発については石川ら(蛋白質・核酸・酵素、前出)に記載されている。つまり、古くは抗体のアミノ基と酵素のアミノ基を利用したグルタルアルデヒド法が用いられてきた。近年、断

い二官能性架橋剤が開発され、アミノ基同士ではなく一方のアミノ基と他方のチオール基を用いることにより、重合体の生成を抑制し、測定感度の向上が達成されてきている。

しかし、従来の方法を用いての酵素標識体の製造は、いずれも生理活性物質である抗原、抗体と酵素を直接結合させるものであるため、反応が微妙で再現性に問題がある、製造に一定以上のサンプル量が必要であり応用できる範囲に限界がある、等の問題が指摘されているのが実情であった。即ち、一般的に抗体の酵素標識においても、抗体のクラスにおける違いのみならず抗体個々においても最適条件が異なる。特に、臨床診断上に重要な抗体に対する抗原は不安定であったり、溶解するため特殊な条件の検討が必要であったり、一つの抗原中にアミノ基とチオール基が共存する場合には、既存の二官能性架橋剤では抗原の重合体が生成したりする等の問題がある。そのため、抗原ごとに標識方法、標識条件の検討をする必要があった。また、分子量の大きい抗原と酵素を反応させ

るには、両者の濃度を上げる必要があり、また少しの条件の変化が標識体の性質に影響し、再現性が悪いことも指摘されていた。更に、場合によっては、現在の直接標識技術では標識体が得られない場合がある

例えば、HTLV-1、HCV、HBsやHIVのようなウィルス抗体に必要な抗原およびアセチルコリンリセプターやTSHリセプターのようなリセプター抗体測定に必要なリセプターは膜タンパクであり、酵素との結合が可能な濃度に抗原を溶解するには、界面活性剤を多量に含む条件が必要である。しかし、この条件では多くの酵素は活性を失うことになる。また、この問題を解決するため、抗体の認識部分であるエピトープのペプチドを抗原として用いる方法もあるが、この場合、認識部分にリジンやシステインのような酵素標識の間に反応に関与するアミノ酸を含む場合が多く、従来の直接酵素標識法を用いることには限界があった。

また、最近、蛍光物質や発光物質を抗原や抗体

に直接標識した標識体も用いられているが、この場合にもリジンやシステインを認識部位に含むペプチドにおいては直接標識法を用いるには限界があった。

これらのことから、より簡単で応用範囲の広い酵素標識法の開発が当業界で要請されているが、このような要請に応えるものとして、ビオチン標識法が開発されている。

例えば、ビオチン標識抗体及び抗体を結合した固相を用いて、検体中の抗原とサンドイッチ状複合体を作製し、次いで、アビジンやストレプトアビジンを結合した酵素や蛍光物質等を反応させることにより、固相に結合した抗原量の測定を行なう方法である(M. Wilkerら, *Analytical Biochemistry*, 171, 1-32, 1988)。

〔発明が解決しようとする課題〕

このビオチン標識体を用いた利点、欠点に関しては、M. Wilkerら(*Analytical Biochemistry*, 前出)に記載されている。

この方法の利点は、ビオチンは安定な化合物で

あり、カルボキシル基を有し、タンパク質やペプチド等と容易に反応し、サクシンイミド(succinimido)基等の官能基の導入が容易であり、この化合物を用いることにより容易にかつ簡単にビオチンをタンパク質やペプチド等に導入することができる点にある。既に様々な官能基を導入した化合物が市販されている。

一方、ビオチンと結合能を有するアビジンやストレプトアビジンに標識物を結合したアビジンやストレプトアビジン標識体は、共通試薬であり、既に種々の標識物についてのアビジン等との結合物が市販されており、容易に合成や入手が可能である。ビオチンとアビジン、ストレプトアビジンの結合力は高く、希薄な溶液中でも定量的に結合することができる。

しかしながら、このビオチン標識体を用いた方法の欠点は、アビジンやストレプトアビジンを結合した標識物が、固相に非特異的に結合しやすいため、測定感度が向上しない点にある。特に検体中に微量にしか存在しない目的物質について高感

度に定量するには、アビジンやストレプトアビジン標識体の固相への非特異的結合による影響を低減させる必要があり、そのような方法の開発が要請されている。

従って、本発明の目的は、固相への非特異的結合の影響を防止した高感度な免疫測定法を提供することにある。

〔課題を解決するための手段〕

かかる実情下、本発明者らは鋭意研究を重ねた。そしてまず、抗原等の免疫反応物質のビオチン結合体とアビジン標識体又はストレプトアビジン標識体とを結合させて、予めビオチン-アビジン又はビオチン-ストレプトアビジンシステムを介した標識体を作成し、次に単離精製した該標識体を用いてサンドイッチ型免疫測定を、アビジン又はストレプトアビジンの共存下において行ったところ、固相への非特異的結合が減少し感度が上昇することを見出し、本発明を完成させた。

即ち、本発明は、

一般式(a)又は(b)で示されるビオチンとアビジ

ンの結合またはビオチンとストレプトアビジンの結合を介した標識体、

(a): X-ビオチン-アビジン-標識物

(b): X-ビオチン-ストレプトアビジン-標識物

(式中、Xは抗原、抗体及び抗抗体からなる群から選ばれる免疫反応物質を表す。)、

及び固相化物質を用いて、アビジン又はストレプトアビジンの共存下において検体中の目的物質を含むサンドイッチ状免疫複合体を固相上に形成せしめる工程を有することを特徴とする目的物質の免疫測定法、

に関するものである。

本発明における標識体において、Xは抗原、抗体及び抗抗体からなる群から選ばれる免疫反応物質を表し、検体中の目的物質と免疫複合体を形成し得るものである。従って、例えば目的物質が抗体の場合、Xは抗原又は抗抗体を、目的物質が抗原の場合、Xは抗体を表す。

ここで、抗原とは抗原抗体反応、免疫応答を誘起し得る物質を言い、タンパク質、多糖、それら

の複合体、脂質との複合体等が挙げられ、またこれらの抗原の抗原決定基を含むペプチドをも表すものである。

ここで、抗体とは、抗体の一部である (Fab)₂ や Fab' を含む。

ここで、標識物とは免疫測定法において使用できるものであれば特に限定されず、通常、酵素、発光物質、蛍光物質、金属化合物、放射性物質が挙げられる。例えば、酵素ではβ-D-ガラクトシダーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、発光物質としてはアクリジウム塩、蛍光物質としてはフルオレセインイソチオシアネート、金属化合物としてはユーロビウム錯体、放射性物質としては³H、¹⁴C、¹²⁵I、¹³¹I、³²P等が用いられる。

本発明における標識体は、次のようにして容易に製造することができる。即ち、まず抗原、抗体等の免疫反応物質にビオチンを結合させ、次いで、該ビオチン結合体とアビジンまたはストレプトアビジン標識体を反応せしめ、必要に応じてカラム

等を用いて精製することにより得ることができる。

ビオチン結合体の製造は既存の公知技術に従って容易に行なうことができる (Bayer, B. A. 他, Methods in Enzymology, 62, 308-315 (1979))。即ち、ビオチンの誘導体、例えばサクシニミド誘導体と抗原等の免疫反応物質を緩衝液中で混合するか、又は光反応で行なわれる。反応後、必要に応じて未反応のビオチン誘導体をカラム等を用いて除去する。

また、抗原等の免疫反応物質とビオチンとの間にスペーサを入れることが望ましい場合がある。例えば、抗原にグルタチオン基 (glutathione) を導入し、次いでビオチン誘導体を反応せしめることによって得ることもできる。

免疫反応物質が抗体又は分子量5万以上の抗原の場合、抗体又は抗原1分子に結合するビオチンは通常1分子から10分子までであり、好ましくは1分子から4分子が望ましい。

免疫反応物質が分子量5,000以上5万未満の抗原又は抗体の一部の場合、抗体1分子に結合する

ビオチンは通常1分子から5分子までであり、好ましくは1分子から2分子が望ましい。

免疫反応物質が分子量5,000未満の抗原又は抗原の抗原決定基を含むペプチドの場合は、抗体1分子に結合するビオチンは通常1分子から2分子までであり、好ましくは1分子である。

アビジン又はストレプトアビジン標識体の製造も公知の技術で容易に行なうことができる (Bayer 他, 前出)。例えば、標識物が酵素の場合、β-ガラクトシダーゼのアビジン標識酵素は、アビジンとN-サクシニミジル-6-マレイミドヘキサノエート (N-succinimidyl-6-maleimido-hexanoate) を反応せしめることにより、アビジンまたはストレプトアビジンにマレイミド基を導入し、次いでβ-ガラクトシダーゼと反応せしめることによって得ることができる。

酵素1分子に結合するアビジン又はストレプトアビジンは、通常1分子から4分子までであり、好ましくは1分子から2分子が望ましい。

標識物が発光物質や蛍光物質の場合、発光や蛍

光を有する物質の反応体、例えばサクシンイミド基を有する反応体とアビジン又はストレプトアビジンと混合することにより得ることができる。

アビジン又はストレプトアビジン1分子に結合する発光物質や蛍光物質の数は1分子から30分子、通常2分子から10分子である。

ビオチン結合体とアビジン又はストレプトアビジン標識体の反応は、両者の溶液を混合することによって得られる。例えば、pH6～9の緩衝液中で、通常0～40℃、好ましくは4～37℃で、通常10分～48時間、好ましくは10分～8時間反応させる。ビオチン結合体とアビジン又はストレプトアビジン標識体の混合比率は、モル比率で、通常0.1～100であり、好ましくは0.3～10の範囲が望ましい。

免疫反応物質が低分子で容易に生成した標識体と未反応ビオチン結合体の分離が容易な場合は、ビオチン結合体を過剰に入れることができる。

免疫反応物質が高分子で容易に生成した標識体と未反応アビジン又はストレプトアビジン標識体

の分離が容易な場合は、アビジン又はストレプトアビジン標識体を過剰に入れることができる。

本発明の免疫測定法は、前記のような方法により得られた標識体及び固相化物質を用いて、アビジン又はストレプトアビジンの共存下において検体中の目的物質を含むサンドイッチ状免疫複合体を固相に結合した後、標識物を測定することにより目的物質の量を測定するものである。ここで、固相化物質とは、目的物質を固相に結合させ、サンドイッチ状免疫複合体を固相上に形成せしめることのできる物質をいう。通常目的物質が抗原の場合は抗体を、目的物質が抗体の場合は、抗原又は抗抗体等を表すものである。固相化物質は固相上に結合させるか、結合対の一方を標識して用いられる。

本発明において、アビジン又はストレプトアビジンを共存させる方法としては、標識体としてビオチンとアビジンの結合を介したものをを用いる場合にはアビジンを、ビオチンとストレプトアビジンの結合を介したものをを用いる場合にはストレプ

トアビジンを標識体を加える際に、通常同時に添加する。添加方法としては、例えばアビジンを含む緩衝液中に固相化物質を溶解し、標識体と検体中の目的物質を反応させる方法が挙げられる。本発明において、アビジン又はストレプトアビジンを共存させた場合、アビジン等が固相に非特異的に結合するため、標識体の固相への非特異的結合が妨げられるので、高感度な免疫測定が可能となる。従って、アビジン等の添加量はこのような標識体の固相への非特異的結合を妨げるに十分な量であることが必要である。添加量は通常、1回のアッセイにつき1～300μgであり、好ましくは5～50μgである。1μgよりも少ないと、固相への非特異的結合の減少効果は充分ではなく、逆に300μgよりも多いと反応液の粘度が上昇し、反応上好ましくない。

次に、本発明の免疫測定法について説明する。この方法には次の2つの方法に分類され4種の態様が例示される。

第1の方法は、固相上に形成されたサンドイッ

チ状免疫複合体中の標識物を測定する方法である。

第2の方法は固相上に形成されたサンドイッチ状免疫複合体を固相より溶出した後、標識物を測定する方法である。

まず、第1の方法の例である第1の態様は、標識体と固相に結合した固相化物質とアビジンまたはストレプトアビジンの共存下において、測定対象物質である検体中の目的物質とのサンドイッチ状免疫複合体を固相上に形成し、固相に結合した標識物を測定する方法である。

測定方法としては、目的物質を含む検体と固相化物質とを反応せしめ、検体を吸引後固相を洗浄し、次いで、固相と標識体を反応せしめる。未反応の標識体を吸引し、固相を洗浄した後、固相に結合した標識物を測定する。あるいは、標識体、固相化物質、及び目的物質を含む検体を同時に反応させ、反応液を吸引し、固相を洗浄した後、固相に結合した標識物を測定する方法でもよい。測定の条件は既知のサンドイッチ法免疫測定法と同様に行なうことができる。

この第一の態様における固相化物質の製造は、既知のタンパク質を固相に結合するいずれの方法であってもよい。

例えば、固相としては、アガロース、ポリスチレン、ポリアクリル、テフロン、紙、ガラス等が通常用いられ、好ましくはポリスチレンがよい。抗原を固相に結合する方法としては、通常物理的吸着により行なうことができる。また、抗原がハプテンのときは、抗原を適当なキャリアタンパクと結合して、固相に結合する。キャリアタンパクとしては、アルブミン、非特異イムノグロブリン等が挙げられる。また、抗体と結合した固相の製造方法は、石川らによる方法(Scand. J. Immunol., 8, 43 (1978))の方法により行なうことができる。

第1の方法の例である第2の態様は、検体中の目的物質と免疫複合体を形成する固相化物質中の抗原等が第1の態様では直接固相に結合しているのに対し、第2の態様では、一組の結合対を有する物質の固定化物質を介してサンドイッチ状免疫

複合体を固相上に形成させる方法である。ここでいう結合対とは、物理的結合によって強固に選択的に結合できる物質の対をいう。例えば、ハプテンと抗ハプテン抗体が例として挙げられる。本発明の結合対にはヒオチン-アビジン又はストレプトアビジンの結合対は含まない。また、測定対象である目的物質と標識体の反応に影響する結合対は用いることができない。望ましい結合対はジニトロフェニル基と抗ジニトロフェニル基抗体が例示される。

固相化物質に標識する結合対の一方(例えば、前記の例ではジニトロフェニル基)は、低分子側が望ましい。即ち、ハプテンと抗ハプテン抗体の結合対においては、ハプテンを抗原等に標識するのが望ましい。

このような望ましい結合対の一方としてジニトロフェニル基が挙げられる。

結合対の一方を結合させた抗原又は抗体の製造法は公知の方法によって得られる。例えば、橋田他, J. Appl. Biochem., 6, 56 (1984)に記載さ

れたようにN-サクシニミジル-6-マレイミドヘキサノエートを架橋剤として用いて容易に得ることができる。

結合対の他方(例えば、前記の例では抗ジニトロフェニル基抗体)は、一方がハプテンの場合抗ハプテン抗体である。このような望ましい結合対の他方として、抗ジニトロフェニル基抗体が挙げられる。

結合対の他方が結合した固相の製造方法は既知のタンパク質を固相に結合するいずれの方法であってもよい。

測定方法としては、標識体と結合対の一方で標識した固相化物質を目的物質を含む検体に加え、反応後、結合対の他方が結合した固相に反応液を加え反応を行い、その後、反応液を吸引し、固相を洗浄した後、固相に結合した標識物を測定する方法、あるいは標識体、結合対の一方で標識した固相化物質、及び結合対の他方が結合した固相を同時に目的物質を含む検体中に加え、反応後、反応液を吸引し、固相を洗浄した後、固相に結合し

た標識物を測定する方法である。後者の方がステップが少なく、望ましい。

測定の条件は既知のサンドイッチ法免疫測定法と同様の方法で行なうことができる。

本発明においては第1の態様、第2の態様のいずれにおいても、従来法に比し高感度の結果が得られるが、第2の態様の方がより感度の高い結果が得られ、望ましい。

第2の方法の例である第3の態様は、第1又は第2の態様で固相に結合したサンドイッチ状免疫複合体を溶出した後、溶出液中の標識物を測定する方法である。

標識体を用い、検体中の目的物質を含むサンドイッチ状免疫複合体を形成せしめる方法として第1の態様を採った場合には、抗原等を固相に結合する際に、サンドイッチ状免疫複合体を解離せずに溶出できる結合を介して結合しておく必要がある。

望ましい方法は、第2の態様でサンドイッチ状免疫複合体を固相に結合し、洗浄後、結合対の一

方またはそれを含む化合物を加え、固相よりサンドイッチ状免疫複合体を溶出することができる。結合対の一方又はそれを含む化合物の具体例として、結合対の一方で標識した抗原としてジニトロフェニル基標識抗原を、結合対の他方が結合した固相として抗ジニトロフェニル基抗体を結合した固相を用いた時は、ジニトロフェノールーリジンが挙げられる。

溶出には、結合対の一方又はそれを含む化合物を0.1～1.0mM含むpH6.0～9.0の緩衝液を加え、通常0～40℃、好ましくは20～37℃、通常10分～48時間、好ましくは1～6時間で行なうのが望ましい。

第2の方法の例である第4の態様は、第3の態様で溶出された免疫複合体を、新しい固相に結合する方法である。新しい固相としては、サンドイッチ状免疫複合体を結合する能力があり、標識物を結合する能力のない固相をいう。望ましい固相として目的物質が抗体の場合、抗抗体を結合した固相が挙げられる。特に抗抗体として、IgG、

A、M等の抗体のクラスを識別できる抗体を選ぶことにより、検体中の抗体のクラス別の抗体を測定することができる。

測定方法としては、第3の態様で結合対の一方又はそれを含む化合物と同時に新しい固相を加えると、サンドイッチ状免疫複合体を固相から溶出と同時に新しい固相に結合させることができ、望ましい方法である。その後、反応液を吸引し、新しい固相を洗浄した後、新しい固相に結合した標識物を測定する方法である。

標識物の測定は、通常の免疫測定法における測定と同様に行われ、公知の方法で行うことができる。

標識体の固相への非特異的吸着の影響を低減するには、第2の方法が好ましく、特に第4の態様が望ましい。

〔以下余白〕

〔実施例〕

以下、実施例、参考例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

ウサギ抗アンギオテンシンII IgGの標準液の調製：

アンギオテンシンIをグルタルアルデヒドを用いる公知の方法で牛血清アルブミンと結合した。このアンギオテンシンI-牛血清アルブミンを6乃至9週間の間隔で完全フロイントアジュバンドと共にニュージーランドホワイトラビットに免疫し、ウサギ抗アンギオテンシンI抗血清を得た〔田中ら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 160, 40-45 (1989)〕。

この抗血清より、硫酸ナトリウムによる塩析とDEAEセルロースを用い、IgGを精製し、単位体積当りのIgGを測定した。

得られた全IgGを用いてFab'-ペルオキシダーゼを作成し〔田中ら、Biochem. Biophys. Res. Commun., 前出〕、この標識体をアンギオテンシ

ンI-セファローズ4Bカラムに吸着させた。カラムに附加されたペルオキシダーゼ活性のうち、5.1%が吸着された。抗血清の全IgG中の5.1%が抗アンギオテンシンII IgGであった。

この抗アンギオテンシンII IgGをウサギ血清で希釈して、種々の濃度のウサギ抗アンギオテンシンII IgGの標準液を調製した。

緩衝液：

緩衝液A：0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0を調製し緩衝液Aとした。

緩衝液B：5mM EDTAを含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH6.0を調製し緩衝液Bとした。

緩衝液C：0.1M塩化ナトリウム、0.1g/ℓウシ血清アルブミン（フラクションV、アーマー社、カンカキー、イリノイ州）、1.0mM塩化マグネシウムおよび1.0g/ℓアジ化ナトリウムを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0を調製し緩衝液Cとした。

緩衝液D：1.0g/ℓウシ血清アルブミン、1.0mM塩化マグネシウムおよび1.0g/ℓアジ化ナトリ

ウムを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0を調製し緩衝液Dとした。

β -D-ガラクトシダーゼの活性測定:

β -D-ガラクトシダーゼ活性は、4-メチルウンベリフェリル β -D-ガラクトシドを基質として、30℃、150 分間反応後、公知の方法で蛍光光学的に測定した〔今川ら、Ann. Clin. Biochem. 21、310-317(1984)〕。蛍光強度は、 10^{-6} M 4-メチルウンベリフェロンを溶解した0.1Mグリシン-NaOH緩衝液、pH10.3を標準として測定した。

実施例1

(1) β -D-ガラクトシダーゼ-アビジン-ビオチニル-グルタチオン-アンギオテンシンIの調製

(1) マレイミド-アビジンの調製

アビジン (アビジンD, ベクターラボラトリーズ社、カルフォルニア) 3mg を溶解した緩衝液A 0.3 mlに、3.3mM N-サクシニミジル-6-マレイミドヘキサノエート (同仁化学研究所、熊本)

pH7.5) 1.2mlを混合し、混合液に55mM N-サクシニミジル-6-マレイミドヘキサノエートのN,N-ジメチルホルムアミド溶液0.13mlを加え30℃、30分間反応した。反応液からセファデックスG-10のカラム(1.0×45)を用い、緩衝液Bを溶出液として精製した。

(4) グルタチオン-アンギオテンシンIの調製

マレイミド-アンギオテンシンI 0.69mg (0.46 μ mol)を溶解した緩衝液B 2mlに、3.1mM グルタチオンを含む緩衝液B 0.2mlを加え30℃、30分間反応した。反応後、0.1M N-エチルマレイミドを含む緩衝液B 20 μ lを加え、30℃、30分間反応した。

(5) ビオチニル-グルタチオン-アンギオテンシンIの調製

(4)のグルタチオン-アンギオテンシンI溶液2.2mlに、1.0M水酸化ナトリウム 130 μ lを加え、pH7.2に調整後、3.4mMビオチン-N-ハイドロキシサクシニミドのN,N-ジメチルホルムアミド溶液0.2 mlを加え、30℃、30分間反応した。反応液

のN,N-ジメチルホルムアミド溶液30 μ lを加え30℃、30分間反応した。反応液からセファデックスG-25のカラム(1.0×30cm)を用い、緩衝液Bを溶出液として精製した。

アビジンの量は280nmの吸光係数を $1.4g^{-1} \cdot l \cdot cm^{-1}$ 、分子量を68,000として計算した。アビジン1分子当たり1.0個のマレイミド基が結合していた。

(2) β -D-ガラクトシダーゼ-アビジンの調製

β -D-ガラクトシダーゼ2.0mg (3.7nmol)を溶解した緩衝液B 80 μ lに、マレイミド-アビジン 0.5mg (7.4nmol)を溶解した緩衝液B 0.54mlを加え4℃、20時間反応した。反応液からウルトロゲル AcA22のカラム(1.5×45cm)を用い、緩衝液Cを溶出液として精製した。

β -D-ガラクトシダーゼ1分子当たり1.2個のアビジンが結合していた。

(3) マレイミド-アンギオテンシンIの調製

アンギオテンシンI 1.5mg (1.2 μ mol)を溶解した蒸留水0.13mlと0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(

からセファデックスG-10のカラム(1.0×45cm)を用い、緩衝液Aを溶出液として精製した。

(6) β -D-ガラクトシダーゼ-アビジン-ビオチニル-グルタチオン-アンギオテンシンIの調製

β -D-ガラクトシダーゼ-アビジン0.22mg (0.36nmol)を溶解した緩衝液C 1.5 mlに、ビオチニル-グルタチオン-アンギオテンシンI 73 μ g (3.6nmol)を溶解した緩衝液A 0.3 mlを加え、30℃、3時間反応した。反応液からウルトロゲル AcA44のカラム(1.0×45cm)を用い、緩衝液Cを溶出液として精製した。

(2) ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン-アビジン-ビオチニル-グルタチオン-アンギオテンシンIの調製

(1) ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミンの調製

ウシ血清アルブミンにS-アセチルメルカプトサクシニク・アンハイドライドを用いる公知の方法でチオール基を導入し、マレイミド基を導入

したジニトロフェニル- γ -リジンと反応した
〔河野ら、J. Clin. Lab. Anal., 2, 209-214 (1988)〕。

ウシ血清アルブミンの量は 280nmの吸光係数を $0.63 \text{ g}^{-1} \cdot \text{liter} \cdot \text{cm}^{-1}$ 、分子量を66,200として計算した。ジニトロフェニル基の量は 360nmの吸光係数を $17,400 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{liter} \cdot \text{cm}^{-1}$ として計算した。

280nmと 360nmの吸光度測定から、ウシ血清アルブミン1分子当たり5.5個のジニトロフェニル基が結合していた。

(2) メルカプトアセチル-ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミンの調製

ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン3.7mgを溶解した緩衝液A 1.0 mlに、3.3mM N-サクシニミジル-S-アセチルチオアセテートのN,N-ジメチルホルムアミド溶液0.1 mlを加え、30℃、30分間反応した。反応後、1M トリス-塩酸緩衝液 (pH7.0) 50 μ l、0.1M BDTA (pH7.0) 50 μ l 及び 1M ヒドロキシルアミン溶液 (pH7.0) 75 μ l を添加し、30℃で15分間反応した後、反応液からセフ

ァデックスG-25のカラム (1.0×30cm) を用い、緩衝液Bを溶出液として精製した。ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン1分子当たり2.3個のチオール基が結合していた。

(3) マレイミド-アビジンの調製

マレイミド-アビジンは、前項に従って調製した。

(4) ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン-アビジンの調製

メルカプトアセチル-ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン1.0mg (15nmol)を溶解した緩衝液B 0.7 mlに、マレイミド-アビジン1.0mg (15nmol)を溶解した緩衝液B 1.1mlを加え、4℃、20時間反応した。反応液をウルトログルAcA44のカラム (1.5×100 cm) を用い、緩衝液Aを溶出液として精製した。

280 nmと360 nmの吸光度測定から、ウシ血清アルブミン1分子当たり1.1個のアビジンが結合していた。

(5) ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン-ア

ビジン-ビオチニル-グルタチオン-アングiotenシンIの調製

ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン-アビジン48 μ g (0.36nmol)を溶解した緩衝液A 1.7 mlに、ビオチニル-グルタチオン-アングiotenシンI 73 μ g (36nmol)を溶解した緩衝液A 0.3 mlを加え、30℃、3時間反応した。反応液からウルトログルAcA44のカラム (1.0×45cm) を用い、緩衝液Cを溶出液として精製した。

(3) アフィニティー精製ウサギ (抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化固相の調製

ウサギ (抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG をジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン-セファローズ4Bのカラムに吸着後、pH2.5で溶出した。このアフィニティー精製ウサギ (抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG の0.1 g / μ l 溶液を用いて、3.2 mmφのポリスチレンビーズ表面上に公知の方法〔石川ら、Scan d. J. Immunol. 第8巻 (補7) 43頁 (1978)〕で

物理吸着により不溶化した。

(4) ウサギ抗アングiotenシンI IgGの測定

ウサギ抗アングiotenシンI IgG の標準液20 μ l を0.33M NaCl及び77ng / μ l アビジンを含む緩衝液D 130 μ l に溶解したジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン-アビジン-ビオチニル-グルタチオン-アングiotenシンI (100fmol) 及び β -D-ガラクトシダーゼ-アビジン-ビオチニル-グルタチオン-アングiotenシンI (100fmol) と共に20℃にて3時間振盪下保温する。保温後、反応液をアフィニティー精製ウサギ (抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化固相

(2個) と共に20℃にて3時間振盪下保温、その後、4℃にて一晩静置した。その後、アフィニティー精製ウサギ (抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化固相を0.1M NaClを含む緩衝液D 2 mlで2回洗浄後、結合した β -D-ガラクトシダーゼ活性を測定した。

その結果を第1図に示した。

参考例1

ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン-アビジン-ビオチニル-グルタチオン-アングiotenシンI、 β -D-ガラクトシダーゼ-アビジン-ビオチニル-グルタチオン-アングiotenシンI及びアフィニティー精製ウサギ(抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化固相は実施例1の方法で調製した。

ウサギ抗アングiotenシンI IgGの測定

ウサギ抗アングiotenシンI IgG の標準液20 μ lを0.33M NaClを含む緩衝液D 130 μ lに溶解したジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン-アビジン-ビオチニル-グルタチオン-アングiotenシンI (100fmol) 及び β -D-ガラクトシダーゼ-アビジン-ビオチニル-グルタチオン-アングiotenシンI (100fmol) と共に20℃にて3時間振盪下保温する。保温後、反応液をアフィニティー精製ウサギ(抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化固相(2個)と共に20℃にて3時間振盪下保温、その後、4℃にて一晩静置した。その後、アフィニティー精製ウサギ(抗ジニ

グルタチオン-アングiotenシンI (100fmol) と共に20℃にて3時間振盪下保温する。保温後、反応液をアフィニティー精製ウサギ(抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化固相(2個)と共に20℃にて3時間振盪下保温、さらに4℃にて一晩静置した。その後、アフィニティー精製ウサギ(抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化固相を0.1M NaClを含む緩衝液D 2mlで2回洗浄した。洗浄後、アフィニティー精製ウサギ(抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化固相を1.0mMジニトロフェニル-L-リジン及び0.3M NaClを含む緩衝液D 150 μ lと共に20℃にて1時間振盪下保温する。保温後、アフィニティー精製ウサギ(抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化固相を取り去り、溶液中に含まれる β -D-ガラクトシダーゼ活性を測定した。

その結果を第2図に示した。

参考例2

ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン-アビ

トロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化固相を0.1M NaClを含む緩衝液D 2mlで2回洗浄後、結合した β -D-ガラクトシダーゼ活性を測定した。

その結果を第1図に示した。

実施例2

ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン-アビジン-ビオチニル-グルタチオン-アングiotenシンI、 β -D-ガラクトシダーゼ-アビジン-ビオチニル-グルタチオン-アングiotenシンI及びアフィニティー精製ウサギ(抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化固相は実施例1の方法で調製した。

ウサギ抗アングiotenシンI IgGの測定

ウサギ抗アングiotenシンI IgG の標準液20 μ lを0.33M NaCl及び77mg/lアビジンを含む緩衝液D 130 μ lに溶解したジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン-アビジン-ビオチニル-グルタチオン-アングiotenシンI (100fmol) 及び β -D-ガラクトシダーゼ-アビジン-ビオチニル-

ジン-ビオチニル-グルタチオン-アングiotenシンI、 β -D-ガラクトシダーゼ-アビジン-ビオチニル-グルタチオン-アングiotenシンI及びアフィニティー精製ウサギ(抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化固相は実施例1の方法で調製した。

ウサギ抗アングiotenシンI IgGの測定

ウサギ抗アングiotenシンI IgG の標準液20 μ lを0.33M NaClを含む緩衝液D 130 μ lに溶解したジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン-アビジン-ビオチニル-グルタチオン-アングiotenシンI (100fmol) 及び β -D-ガラクトシダーゼ-アビジン-ビオチニル-グルタチオン-アングiotenシンI (100fmol) と共に20℃にて3時間振盪下保温する。保温後、反応液をアフィニティー精製ウサギ(抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化固相(2個)と共に20℃にて3時間振盪下保温、その後、4℃にて一晩静置した。その後、アフィニティー精製ウサギ(抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化

固相を0.1 M NaClを含む緩衝液D 2 mlで2回洗浄した。洗浄後、アフィニティー精製ウサギ(抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化固相を1.0 mMジニトロフェニル-L-リジン及び0.3 M NaClを含む緩衝液D 150 μ lと共に20℃にて1時間振盪下保温する。保温後、アフィニティー精製ウサギ(抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化固相を取り去り、溶液中に含まれる β -D-ガラクトシダーゼ活性を測定した。

その結果を第2図に示した。

実施例3

ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン-アビジン-ビオチニル-グルタチオン-アングiotenシンI、 β -D-ガラクトシダーゼ-アビジン-ビオチニル-グルタチオン-アングiotenシンI及びアフィニティー精製ウサギ(抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化固相は実施例1の方法で調製した。

(1) アフィニティー精製(抗ウサギIgG) IgG 不

後、4℃にて一晩静置した。その後、アフィニティー精製ウサギ(抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化固相を0.1 M NaClを含む緩衝液D 2 mlで2回洗浄した。洗浄後、アフィニティー精製ウサギ(抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化固相を1.0 mMジニトロフェニル-L-リジン及び0.3 M NaClを含む緩衝液D 150 μ lとアフィニティー精製(抗ウサギIgG) IgG 不溶化固相(2個)と共に20℃にて1時間振盪下保温する。保温後、アフィニティー精製ウサギ(抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化固相を取り去り、さらに20℃にて2時間振盪下保温した。アフィニティー精製(抗ウサギIgG) IgG 不溶化固相を0.1 M NaClを含む緩衝液D 2 mlで2回洗浄後、結合した β -D-ガラクトシダーゼ活性を測定した。

その結果を第3図に示した。

参考例3

ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン-アビジン-ビオチニル-グルタチオン-アングioten

溶化固相の調製

(抗ウサギIgG) IgG をウサギIgG-セファローズ4Bのカラムに吸着後、pH2.5で溶出した。このアフィニティー精製ウサギ(抗ウサギIgG) IgGの0.1 g/l溶液を用いて、3.2 mmφのポリスチレンビーズ表面上に公知の方法〔石川ら、Scand. J. Immunol.、前出〕で物理吸着により不溶化した。

(2) ウサギ抗アングiotenシンI IgGの測定

ウサギ抗アングiotenシンI IgG の標準液20 μ lを0.33 M NaCl及び77 ng/lアビジンを含む緩衝液D 130 μ lに溶解したジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン-アビジン-ビオチニル-グルタチオン-アングiotenシンI (100 fmol)及び β -D-ガラクトシダーゼ-アビジン-ビオチニル-グルタチオン-アングiotenシンI (100 fmol)と共に20℃にて3時間振盪下保温する。保温後、反応液をアフィニティー精製ウサギ(抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化固相(2個)と共に20℃にて3時間振盪下保温、その

シンI、 β -D-ガラクトシダーゼ-アビジン-ビオチニル-グルタチオン-アングiotenシンI及びアフィニティー精製ウサギ(抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化固相は実施例1の方法で調製した。アフィニティー精製(抗ウサギIgG) IgG 不溶化固相は実施例3の方法で調製した。

ウサギ抗アングiotenシンI IgGの測定

ウサギ抗アングiotenシンI IgG の標準液20 μ lを0.33 M NaClを含む緩衝液D 130 μ lに溶解したジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン-アビジン-ビオチニル-グルタチオン-アングiotenシンI (100 fmol)及び β -D-ガラクトシダーゼ-アビジン-ビオチニル-グルタチオン-アングiotenシンI (100 fmol)と共に20℃にて3時間振盪下保温する。保温後、反応液をアフィニティー精製ウサギ(抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化固相(2個)と共に20℃にて3時間振盪下保温、その後、4℃にて一晩静置した。その後、アフィニティー精製ウサギ(抗ジ

ニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化固相を0.1 M NaClを含む緩衝液D 2 mlで2回洗浄した。洗浄後、アフィニティー精製ウサギ (抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化固相を1.0 mMジニトロフェニル-L-リジン及び0.3 M NaClを含む緩衝液D 150 μ lとアフィニティー精製 (抗ウサギIgG) IgG 不溶化固相 (2個) と共に20℃にて1時間振盪下保温する。保温後、アフィニティー精製ウサギ (抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化固相を取り去り、さらに20℃にて2時間振盪下保温した。アフィニティー精製 (抗ウサギIgG) IgG 不溶化固相を0.1 M NaClを含む緩衝液D 2 mlで2回洗浄後、結合した β -D-ガラクトシダーゼ活性を測定した。

その結果を第3図に示した。

実施例 4

アフィニティー精製ウサギ (抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化固相は実施例1の方法で調製した。アフィニティー精製 (抗

溶出液として精製した。

(2) ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン-アビジン-ビオチン-アンギオテンシン I の調製

実施例1で調製したジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン-アビジン48 μ g (0.36 nmol)を溶解した緩衝液A 1.7 mlにビオチン-アンギオテンシン I 5.5 μ g (3.6 nmol)を溶解した緩衝液A 0.3 mlを加え、30℃、30分間反応した。反応液からウルトロゲルAcA44のカラム(1.0×45cm)を用い、緩衝液Cを溶出液として精製した。

(3) ウサギ抗アンギオテンシン I IgGの測定

ウサギ抗アンギオテンシン I IgG の標準液20 μ lを0.33 M NaCl 及び77 mg/lアビジンを含む緩衝液D 130 μ lに溶解したジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン-アビジン-ビオチン-アンギオテンシン I (100 fmol) 及び β -D-ガラクトシダーゼ-アビジン-ビオチン-アンギオテンシン I (100 fmol) と共に20℃にて3時間振盪下保温する。保温後、反応液をアフィニティー精製ウ

サギIgG) IgG 不溶化固相は実施例3の方法で調製した。

(1) β -D-ガラクトシダーゼ-アビジン-ビオチン-アンギオテンシン I の調製

(1) ビオチン-アンギオテンシン I の調製

アンギオテンシン I 1.0 mg (0.77 μ mol)を溶解した蒸留水0.18 mlと緩衝液A 1.6 mlを混合し、混合液に44 mMビオチン-N-ハイドロキシサクシニミドのN,N-ジメチルホルムアミド溶液0.18 mlを加え、30℃、30分間反応した。反応液からセファデックス G-10のカラム(1.0×45cm)を用い、緩衝液Aを溶出液として精製した。

(2) β -D-ガラクトシダーゼ-アビジン-ビオチン-アンギオテンシン I の調製

実施例1で調製した β -D-ガラクトシダーゼ-アビジン0.22 mg (0.36 nmol)を溶解した緩衝液C 1.5 mlにビオチン-アンギオテンシン I 5.5 μ g (3.6 nmol)を溶解した緩衝液A 0.3 mlを加え、30℃、3時間反応した。反応液からウルトロゲルAcA44のカラム(1.0×45cm)を用い、緩衝液Cを

サギ (抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化固相 (2個) と共に20℃にて3時間振盪下保温、さらに4℃にて一晩静置した。その後、アフィニティー精製ウサギ (抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化固相を0.1 M NaClを含む緩衝液D 2 mlで2回洗浄した。洗浄後、アフィニティー精製ウサギ (抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化固相を1.0 mMジニトロフェニル-L-リジン及び0.3 M NaClを含む緩衝液D 150 μ lとアフィニティー精製 (抗ウサギIgG) IgG 不溶化固相 (2個) と共に20℃にて1時間振盪下保温する。保温後、アフィニティー精製ウサギ (抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化固相を取り去り、さらに20℃にて2時間振盪下保温した。アフィニティー精製 (抗ウサギIgG) IgG 不溶化固相を0.1 M NaClを含む緩衝液D 2 mlで2回洗浄後、結合した β -D-ガラクトシダーゼ活性を測定した。

その結果を第4図に示した。

参考例 4

アフィニティー精製ウサギ (抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化固相は、実施例1の方法で調製した。アフィニティー精製

(抗ウサギIgG) IgG 不溶化固相は、実施例3の方法で調製した。 β -D-ガラクトシダーゼ-アビジン-ビオチニル-アングiotenシンI及びジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン-アビジン-ビオチニル-アングiotenシンIは、実施例4の方法で調製した。

ウサギ抗アングiotenシンI IgGの測定

ウサギ抗アングiotenシンI IgG の標準液20 μ lを0.33 M NaClを含む緩衝液D 130 μ lに溶解したジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン-アビジン-ビオチニル-アングiotenシンI (100fmol) 及び β -D-ガラクトシダーゼ-アビジン-ビオチニル-アングiotenシンI (100fmol) と共に20℃にて3時間振盪下保温する。保温後、反応液をアフィニティー精製ウサギ (抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化固相 (2個) と共に20℃にて3時間振盪下保温、さらに4

℃にて一晩静置した。その後、アフィニティー精製ウサギ (抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化固相を0.1 M NaClを含む緩衝液D 2 mlで2回洗浄した。洗浄後、アフィニティー精製ウサギ (抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化固相を1.0 mMジニトロフェニル-L-リジン及び0.3 M NaClを含む緩衝液D 150 μ lとアフィニティー精製 (抗ウサギIgG) IgG 不溶化固相 (2個) と共に20℃にて1時間振盪下保温する。保温後、アフィニティー精製ウサギ (抗ジニトロフェニル-ウシ血清アルブミン) IgG 不溶化固相を取り去り、さらに20℃にて2時間振盪下保温した。アフィニティー精製 (抗ウサギIgG) IgG 不溶化固相を0.1 M NaClを含む緩衝液D 2 mlで2回洗浄後、結合した β -D-ガラクトシダーゼ活性を測定した。

その結果を第4図に示した。

参考例5

(1) (抗ウサギIgG) F_{ab'}-ペルオキシダーゼの調製

(抗ウサギIgG) F_{ab'}は、N-サクシニミジル-6-マレイミドヘキサノエートを架橋剤として、公知の方法〔橋田ら、J. Appl. Biochem., 6, 56-63 (1984)〕でペルオキシダーゼ標識した。

(2) アングiotenシンI-ウシ血清アルブミン不溶化固相の調製

(1) メルカプトアセチル-ウシ血清アルブミンの調製

ウシ血清アルブミン2.0 mgを溶解した緩衝液A 0.4 mlに8.8 mM N-サクシニミジル-S-アセチルチオアセテートのN,N-ジメチルホルムアミド溶液40 μ lを加え、30℃、30分間反応した。反応後、反応液を1.0 M トリス-塩酸緩衝液 (pH7.0) 40 μ l、0.1 M EDTA (pH7.0) 40 μ l及び1.0 M ヒドロキシルアミン塩酸塩溶液 (pH7.0) 60 μ lと共に30℃で15分間反応した。反応液からセファデックス G-25 のカラム (1.0 \times 30cm) を用い、緩衝液Bを溶出液として精製した。ウシ血清アルブミン1分子当たり6.0個のチオール基が結合していた。

(2) アングiotenシンI-ウシ血清アルブミンの

調製

メルカプトアセチル-ウシ血清アルブミン1.5mg (23nmol)を溶解した緩衝液B 3 mlに実施例1で調製したマレイミド-アビジン0.34mg (230nmol)を溶解した緩衝液B 3 mlを加え、30℃、30分間反応した。反応液からウルトロゲルACA44のカラム (1.5 \times 45cm) を用い、0.1% NaN₃を含む0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.5)を溶出液として精製した。

チオール基の減少から、ウシ血清アルブミン1分子当たり6.0個のアングiotenシンIが結合していた。

(3) アングiotenシンI-ウシ血清アルブミン不溶化固相の調製

アングiotenシンI-ウシ血清アルブミンの0.1 g/l溶液を用いて、3.2 mm ϕ のポリスチレンビーズ表面上に公知の方法〔石川ら、Scand. J. Immunol., 前出〕で物理吸着により不溶化した。

(3) ウサギ抗アングiotenシンI IgGの測定

ウサギ抗アングiotenシンI IgG の標準液20 μ

2を0.33 M NaCl 及び1.0 g/ℓウシ血清アルブミンを含む10mM リン酸ナトリウム緩衝液 130μℓを混合した。混合液をアンギオテンシンI-ウシ血清アルブミン不溶化固相と共に37℃にて3時間振盪下保温した。その後、アンギオテンシンI-ウシ血清アルブミン不溶化固相を0.1 M NaCl を含む10mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) 2 ml で2回洗浄した。洗浄後、アンギオテンシンI-ウシ血清アルブミン不溶化固相を0.3 M NaCl 及び1.0 g/ℓウシ血清アルブミンを含む10mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) 150μℓに溶解した(抗ウサギIgG) F_{ab}'-ペルオキシダーゼ(50ng)と共に37℃にて3時間振盪下保温する。保温後、アンギオテンシンI-ウシ血清アルブミン不溶化固相を同様に洗浄し、結合したペルオキシダーゼ活性を測定した。

ペルオキシダーゼ活性は3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸を水素供与体として蛍光光学的に測定した。蛍光強度は50mM硫酸に溶解した1 mg/ℓキニーネを標準として測定した。

その結果を第5図に示した。

4. 図面の簡単な説明

第1図は実施例1及び参考例1の測定結果を示したものである。

第2図は実施例2及び参考例2の測定結果を示したものである。

第3図は実施例3及び参考例3の測定結果を示したものである。

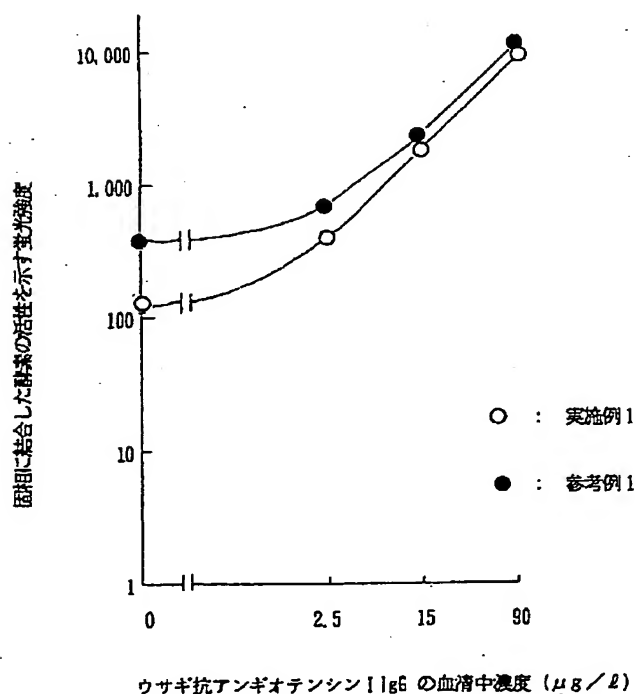
第4図は実施例4及び参考例4の測定結果を示したものである。

第5図は参考例5の測定結果を示したものである。これらの図において、横軸は測定対象であるウサギ抗アンギオテンシンI IgG の血清中濃度を、縦軸は検出された標識の量を表す蛍光強度である。

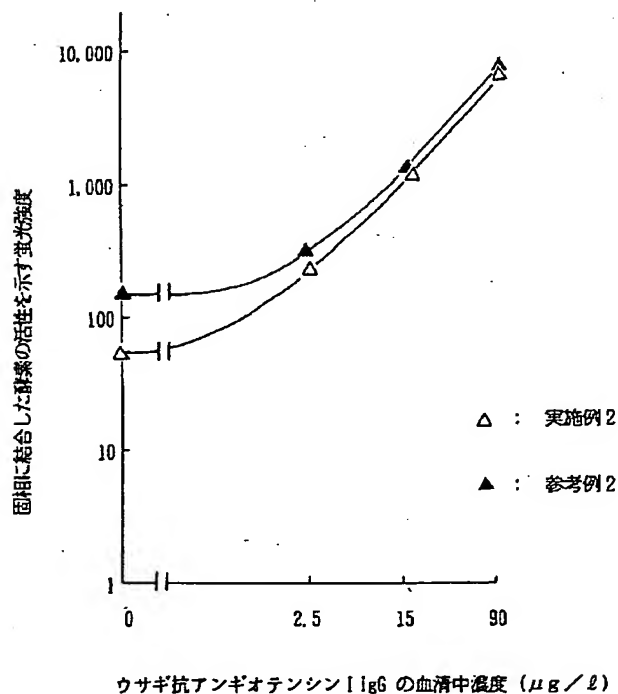
特許出願人 石川栄治

代理人弁理士 細田芳徳 (ほか1名)

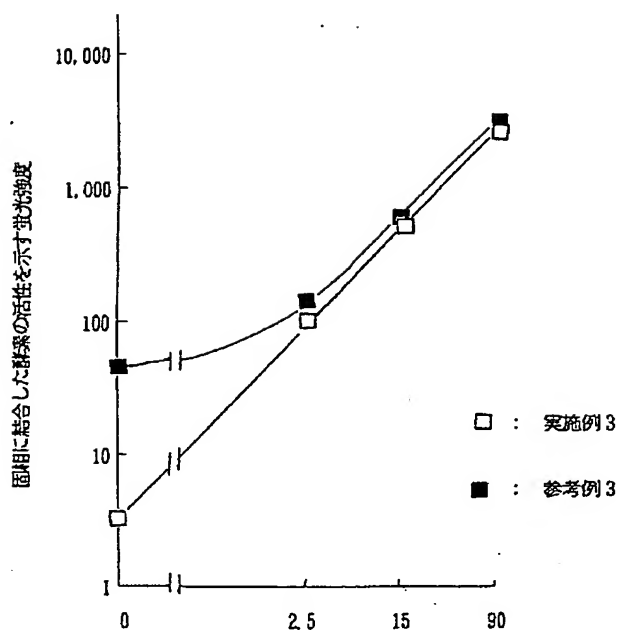
第1図



第2図

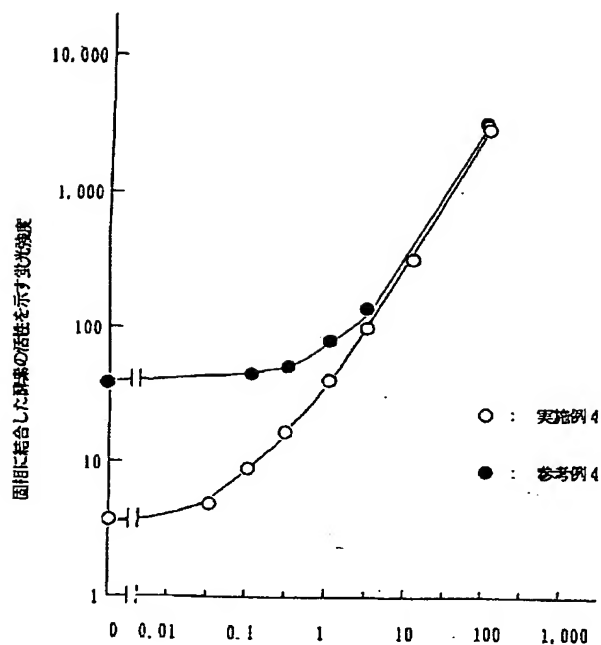


第3図



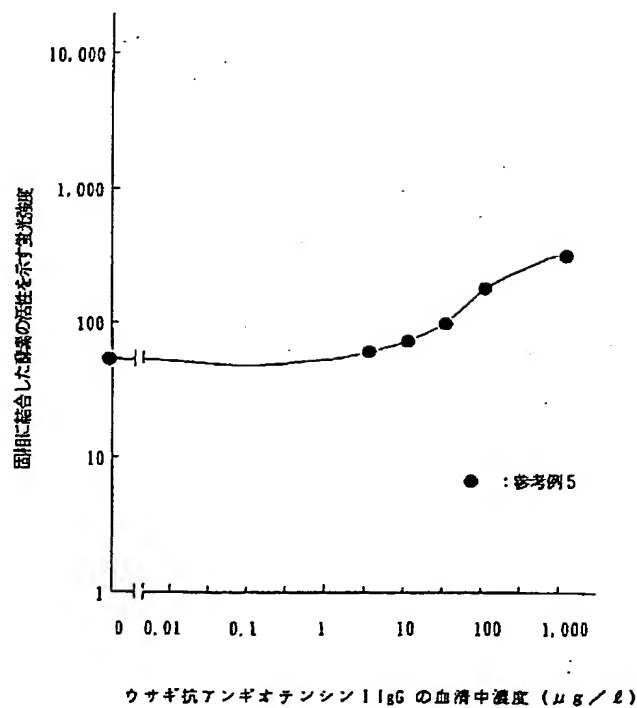
ウサギ抗アンギオテンシン II IgG の血清中濃度 (μg/2)

第4図



ウサギ抗アンギオテンシン II IgG の血清中濃度 (μg/2)

第5図



ウサギ抗アンギオテンシン II IgG の血清中濃度 (μg/2)